

# Respuesta productiva de becerros Holstein alimentados con alfalfa de diferente calidad y enzimas fibrolíticas en la etapa pre y pos destete

## Productive performance of Holstein calves fed different quality alfalfas and fibrolytic enzyme supplements during the pre and postweaning periods

Mauricio Javier Flores Bernal<sup>a</sup>, Felipe de Jesús Ruiz López<sup>b</sup>, María de Jesús Guerrero Carrillo<sup>c</sup>, José Luis Romano Muñoz<sup>b</sup>

### RESUMEN

La adición de enzimas fibrolíticas (EF) y alfalfa de diferente calidad se evaluó en 36 becerros Holstein de siete días de edad, en los periodos pre y posdestete, sobre comportamiento productivo, digestibilidad aparente y evolución ruminal. Antes del destete, los animales fueron alimentados con 4 L de leche (LE), alimento iniciador (IN) y heno de alfalfa. Los tratamientos fueron: 1) LE-IN + alfalfa baja en fibra; 2) como 1 + EF; 3) LE-IN + alfalfa regular en fibra; 4) como 3 + EF; 5) LE-IN + alfalfa alta en fibra y 6) como 5 + EF. El experimento duró 105 días, con el destete el día 60. Las enzimas mejoraron ( $P < 0.05$ ) ganancia de peso (GP) (610 vs 404 g/día) y eficiencia alimenticia (EA) (0.55 vs 0.41) antes del destete. El consumo de alimento (CA) tendió ( $P = 0.06$ ) a ser mayor (1.99 vs 1.65 kg al día) con EF. El contenido de fibra de la alfalfa no afectó GP, CA y EA ( $P > 0.05$ ). La digestibilidad de materia seca (MS), proteína cruda (PC) y fibra detergente neutro (FDN) no cambió por la calidad de la alfalfa ni por EF ( $P > 0.05$ ) en ambos periodos; se observaron diferencias entre periodos ( $P < 0.05$ ); la digestibilidad de MS, PC y FDN fue: 81.5 y 72.5, 81.9 y 70.8, 62.3 y 45.3 % para los periodos predestete y posdestete, respectivamente. La concentración de ácidos grasos volátiles, tamaño de papilas ruminales y viscosidad del contenido digestivo no fueron afectados ( $P > 0.05$ ). Las enzimas mejoraron la ganancia de peso y la eficiencia sólo en el periodo predestete.

**PALABRAS CLAVE:** Enzimas fibrolíticas, Becerros, Digestibilidad, Desarrollo ruminal.

### ABSTRACT

The effect of fibrolytic enzyme (FE) supplements and alfalfa quality (i.e. fiber content) on calf productive performance, apparent feed digestibility, and rumen development during the pre- and post-weaning period was evaluated. Before weaning, calves were fed daily 4 L of milk (MI) and solid feed (starter concentrate (SC) + alfalfa hay) *ad libitum*. Thirty-six, Holstein calves (3 to 7 d of age) were distributed in a random block design with six treatments: 1) MI-SC + low-fiber alfalfa; 2) treatment 1 + FE; 3) MI-SC + medium-fiber alfalfa; 4) treatment 3 + FE; 5) MI-SC + high-fiber alfalfa; and 6) treatment 5 + FE. Experimental period was 105 d and animals were weaned at d 60. The FE supplement improved ( $P < 0.05$ ) daily weight gain (DWG) (610 g vs 404 g/d) and feed efficiency (FEF) (0.55 vs 0.41) in the preweaning stage. Final dry matter intake (DMI) tended ( $P < 0.05$ ) to be higher (1.99 vs 1.65 kg d<sup>-1</sup>) in the animals that consumed FE-supplemented feed. Alfalfa fiber content did not affect DWG, DMI or final FEF ( $P > 0.05$ ). Apparent feed digestibility was similar among treatments ( $P > 0.05$ ) for dry matter (DM), crude protein (CP), and neutral detergent fiber (NDF). There were significant differences ( $P < 0.05$ ) between the preweaning and postweaning periods in the digestibility coefficients for DM (81.5 vs 70.8 %), CP (72.5 vs 62.3 %) and NDF (81.9 vs 45.3 %). Rumen volatile fatty acid concentration, rumen papillae size, and rumen, abomasum, and intestine digesta viscosity exhibited no significant differences ( $P > 0.05$ ) among treatments. Inclusion of FE improved daily weight gain and feed efficiency in the preweaning period.

**KEY WORDS:** Fibrolytic enzymes, Calves, Digestibility, Rumen development.

Recibido el 5 de septiembre de 2003 y aceptado para su publicación el 5 de noviembre de 2004.

<sup>a</sup> Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.

<sup>b</sup> Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología Animal, INIFAP. Km 1 Carretera a Colón, Ajuchitlán, Querétaro, México. e-mail: romano.jose@inifap.gob.mx. Correspondencia al cuarto autor.

<sup>c</sup> Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Autónoma de Querétaro.

## INTRODUCCIÓN

En la primera etapa de vida de los rumiantes, el rumen, retículo y omaso son fisiológicamente poco activos, y el abomaso del becerro funciona de manera muy semejante a un animal no rumiante. En esta etapa, se necesita principalmente de una dieta líquida altamente digestible, hasta progresar a un punto donde se convierte en un rumiante funcional y utiliza el rumen, el retículo y el omaso para digerir el forraje y otros alimentos<sup>(1)</sup>.

El sistema enzimático en el rumiante recién nacido se encuentra pobremente desarrollado y debido a estas limitaciones digestivas, los ingredientes utilizados en la formulación son críticos para permitir una adecuada digestión y un apropiado crecimiento y rendimiento<sup>(2)</sup>.

El suministro de concentrados y forraje es importante desde los primeros días de edad con el propósito de estimular el desarrollo del rumen-retículo, además de inducir una mejor ingestión de alimento al momento del destete. El proceso de destete dependerá de la rapidez con la que se haya desarrollado el rumen y el retículo, además de la facilidad con que fermenten los alimentos ingeridos<sup>(3)</sup>.

Los componentes fibrosos de la dieta son digeridos por enzimas celulasas y xilanasas producidas por bacterias, protozoarios y hongos ruminales. Se ha sugerido que algunos hidratos de carbono estructurales, como celulosa y hemicelulosa, cuando no son digeridos, crean un ambiente viscoso en el tubo intestinal<sup>(4)</sup>, el cual puede interferir con la interacción de sustratos y enzimas y con la movilidad de productos digestivos, resultando en una disminución potencial de la digestión y absorción. En los becerros en crecimiento temprano el rumen aún se encuentra inmaduro y existe poca digestión ruminal de celulosa y de hemicelulosa<sup>(5)</sup>, lo que puede afectar negativamente la digestión de otros compuestos de la ración<sup>(6)</sup>.

La adición de enzimas en el alimento es comúnmente usada para mejorar el valor nutritivo en dietas para no rumiantes<sup>(7,8)</sup>. Cowan *et al*<sup>(9)</sup> encontraron que la adición de enzimas en ingredientes alimenticios

## INTRODUCTION

In ruminants, the rumen, reticulum and omasum are not quite physiologically active during the first months of life, and the calf's abomasum functions very much like that of a non-ruminant. A highly digestible liquid diet is required at this stage until the animal becomes a functional ruminant and can use the rumen, reticulum and omasum to digest forage and other feed<sup>(1)</sup>.

The enzymatic system of a newborn ruminant is poorly developed, which limits its digestive capacity. As a result, the ingredients used to formulate feed for this stage are critical for proper digestion and for producing sufficient growth and yield<sup>(2)</sup>.

The levels of starter concentrate and forage included in diets for newborn ruminants have a significant effect on stimulating development of the reticulo-rumen and producing better feed digestion at weaning. How quickly weaning occurs depends on the rates of development of the rumen and reticulum as well as on the feed's fermentability<sup>(3)</sup>.

Fibrous components in diets are digested by cellulase and xylanase enzymes produced by rumen bacteria, protozoa, and fungi. Some structural carbohydrates, such as cellulose and hemicellulose, are thought to create a viscous environment in the intestinal tube when not digested<sup>(4)</sup>. This environment can interfere with substrate and enzyme interaction and digestive product mobility, causing a potential decrease in digestion and absorption. Calves in the early growth stage still have an immature rumen that cannot effectively digest cellulose and hemicellulose<sup>(5)</sup>, and this may negatively affect digestion of other feed components<sup>(6)</sup>.

Enzyme supplements are commonly used in feed to improve diet nutritional value for non-ruminants<sup>(7,8)</sup>. Cowan *et al*<sup>(9)</sup> reported that adding enzymes to feed ingredients results in better energy availability and can also improve nitrogen retention when administered in diets for chickens and suckling pigs.

Addition of enzymes to calf feed can potentially improve fibrous components digestibility by complementing the calf's enzyme production. This

resulta en una mejor disponibilidad de energía y que también puede mejorar la retención de nitrógeno al suministrarlo en dietas para pollos y lechones.

La adición de enzimas en el alimento de becerros puede mejorar la digestibilidad de los componentes fibrosos de la dieta, al complementar la producción de las enzimas propias del becerro, y ayudar a disminuir los efectos negativos que se presentan sobre el comportamiento productivo en el periodo de destete, mejorando el crecimiento y la conversión alimenticia.

La literatura relacionada con la utilización de enzimas exógenas para becerros en el periodo pre y posdestete es prácticamente nula; sin embargo, considerando el potencial efecto positivo sobre la digestibilidad del alimento sólido, se podría esperar que al adicionar enzimas fibrolíticas en el iniciador, se mejorará el comportamiento productivo de animales recién destetados. Con base en lo anterior, el objetivo del trabajo fue evaluar el efecto de la adición de un complejo enzimático y la inclusión de heno de alfalfa de diferente calidad en la alimentación de becerros lactantes.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en las instalaciones del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología Animal del INIFAP (CENIDFA), ubicado en Ajuchitlán, Qro., con clima semidesértico y lluvias en verano, temperatura media anual de 15 °C y una precipitación pluvial anual de 450 a 630 mm<sup>(10)</sup>. Las muestras recolectadas se analizaron en los laboratorios de Nutrición del CENIDFA y CENID-Microbiología en Palo Alto, D. F., en el Laboratorio de Histopatología de la Escuela de Veterinaria y en el Postgrado de Química de Alimentos de la Universidad Autónoma de Querétaro.

Se utilizaron 36 becerros Holstein de 3 a 7 días de edad, previamente alimentados con calostro y provenientes de un mismo establo. Los becerros se recibieron en grupos semanales y fueron alojados en becerrerías individuales con piso de cemento, con comedero y bebedero de cubeta. Los animales

may help in decreasing negative effects on performance during weaning, and improving growth and feed conversion. Very little research exists on the use of exogenous enzymes in calves during the pre- and postweaning periods; however, addition of fibrolytic enzymes to starter feed can be expected to improve productive performance in recently weaned animals. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of an enzymatic complex supplement on productive parameters of calves fed different quality alfalfa hays.

## MATERIALS AND METHODS

The experiment was done at the National Center for Research on Animal Physiology (Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología Animal - CENIDFA) of the National Institute of Forestry, Agricultural and Livestock Research (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias - INIFAP) at Ajuchitlán, in the state of Querétaro, México. Climate is semi-desert with summer rains, average annual temperature of 15 °C and rainfall ranging from 450 to 630 mm annually<sup>(10)</sup>. Feed and digestibility samples were analyzed at CENIDFA and CENID Microbiología laboratories; digestive tract tissue was analyzed at the Histopathology Laboratory, School of Veterinary Medicine and Postgraduate School of Food Chemistry of the Autonomous University of Queretaro (Universidad Autónoma de Querétaro).

Thirty six Holstein calves (3 to 7 d of age), previously fed on colostrums, were received in weekly groups and individually placed in calf stalls (cement-floor, plastic buckets as feeder and water source). The animals were randomly distributed into six treatments:

- 1) Whole cow milk (MI) + starter concentrate (SC) + low-fiber alfalfa hay; 2) MI + SC + low-fiber alfalfa hay + fibrolytic enzymes (FE); 3) MI + SC + regular fiber alfalfa hay; 4) MI+ SC + regular fiber alfalfa hay + FE; 5) MI + SC + high-fiber alfalfa hay; 6) MI + SC + high-fiber alfalfa hay + FE.

Calves were fed a total of 4 L of milk a day in two feedings (0800 and 1800) with a plastic bottle.

se distribuyeron al azar a los siguientes tratamientos experimentales:

- 1) Leche entera de vaca + iniciador + heno de alfalfa baja en fibra; 2) leche entera de vaca + iniciador + heno de alfalfa baja en fibra + enzimas fibrolíticas; 3) leche entera de vaca + iniciador + heno de alfalfa regular en fibra; 4) leche entera de vaca + iniciador + heno de alfalfa regular en fibra + enzimas fibrolíticas; 5) leche entera de vaca + iniciador + heno de alfalfa alta en fibra; 6) leche entera de vaca + iniciador + heno de alfalfa alta en fibra + enzimas fibrolíticas.

Los becerros fueron alimentados con 4 L de leche al día dividida en dos tomas (a las 0800 y 1800) y ésta fue ofrecida en biberón de plástico. Se les proporcionó el alimento sólido (según el tratamiento) a libertad; diariamente se ofreció alimento nuevo y se midió la cantidad ofrecida y rechazada para evaluar el consumo. El experimento tuvo una duración de 105 días y el destete se realizó a los 60 días; a partir de éste, se les proporcionó únicamente el alimento sólido, de acuerdo al tratamiento correspondiente, durante 45 días. El pesaje de los animales se realizó al inicio del

Solid feed was provided *ad libitum*, with fresh feed given every day; leftovers were collected daily to calculate feed intake. The experimental period was 105 d: calves were weaned at 60 d of age and only solid feed was provided for the remaining 45 d. Animals were weighed before feeding at the beginning of the trial and every 15 d during the experimental period.

The diet solid fraction was prepared using commercial feed (Apibecerras 18% Ultra, Api-Aba®, in pellets and rolled grain) as a base, then adding 15 % alfalfa hay (dry base) (Table 1). Three different quality alfalfa hays were used: high quality (low-fiber); regular quality (medium fiber); and low quality (high-fiber) (Table 2). Protein content was standardized by adding soybean meal to rations.

The enzymatic complex (Safizym® FP 800, Saf Agri Lesaffre) used to supplement the feed has cellulosic and hemicellulosic activity (endocellulose, cellobiohydrolase and beta-glucosidase) produced by *Trichoderma longibrachiatum* strains, and an activity of 25 U/g (manufacturer specifications). The supplement was added daily to the solid feed

Cuadro 1. Composición y análisis de las dietas (% en base seca)

Table 1. Diet composition and analysis (% dry base)

Ingredient	Treatment					
	LF-NFE	LF-FE	MF-NFE	MF-FE	HF-NFE	HF-FE
Starter feed*	85.0	85.0	82.8	82.8	84.3	84.3
Alfalfa hay	15.0	15.0	15.0	15.0	15.0	15.0
Soybean meal	—	—	2.2	2.2	0.7	0.7
Lab analysis:						
Dry matter	89.8	89.8	89.6	89.6	89.4	89.4
Crude protein	19.7	19.7	19.7	19.7	19.7	19.7
Ash	6.9	6.9	7.1	7.1	7.2	7.2
Neutral detergent fiber	17.7	17.7	18.4	18.4	19.4	19.4
Acid detergent fiber	9.5	9.5	10.3	10.3	10.8	10.8

LF=low-fiber alfalfa; NFE=no fibrolytic enzyme supplement; MF=medium-fiber alfalfa; HF=high-fiber alfalfa; FE=fibrolytic enzyme supplement.

\* Commercial APIBECERRAS 18% ULTRA, api-aba® starter feed, made with: rolled corn, oats, soybean meal, sorghum grain, corn gluten meal, barley, milk whey, wheat bran, canola meal, linseed meal, molasses, and mineral premix.

experimento y a partir de éste, cada 15 días (antes de ofrecer alimento).

Para la elaboración de la fracción sólida de las dietas, se utilizó un alimento comercial (Apibecerras 18% ultra, api-aba®, presentado en forma de comprimidos y grano rolando), al cual se le agregó heno de alfalfa en una proporción de 15 % del alimento sólido en base seca (Cuadro 1). Las alfalfas utilizadas diferían en su contenido de fibra (Cuadro 2); se consideró como alfalfa de buena calidad la de menor contenido de fibra, la alfalfa de calidad regular fue la de contenido medio y alfalfa de mala calidad la de mayor contenido de fibra. Se adicionó pasta de soya a la ración para obtener dietas similares en el contenido de proteína.

Se utilizó un complejo enzimático con actividad celulolítica y hemicelulolítica (endocelulasa, celobiohidrolasa y beta-glucosidasa), producido por cepas de *Trichoderma longibrachiatum* (Safizym® FP 800, Saf Agri Lesaffre). El complejo enzimático se agregó diariamente en el alimento sólido, a razón de 13 g/animal/día, mezclándolo en forma individual. La actividad del producto, reportada por la empresa, fue de 25 U/g.

Se realizaron dos periodos de muestreo para evaluar la digestibilidad aparente de los nutrimentos, uno anterior a la fecha de destete (del día 41 al 50) y otro posterior a la misma (del día 91 al 100). Se utilizó óxido de cromo ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ) como marcador externo. Cada becerro recibió 2 g/día de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  divididos en dos cápsulas de gelatina, las cuales fueron administradas a las 0730 y 1730 durante 10 días de cada periodo. Los primeros cinco días se utilizaron para alcanzar un estado de equilibrio de Cr en el tracto gastrointestinal, y durante los últimos cinco días se colectaron tres muestras de heces diarias (0800, 1200 y 1800) para determinar la digestibilidad aparente de los nutrimentos.

Las muestras de heces fueron secadas en un horno de aire forzado a 55 °C durante 72 h y todas las muestras de heces y alimento se molieron en un molino Wiley con criba de 2 mm. Se hicieron muestras compuestas de heces de cada animal por periodo y se analizaron para la determinación de

Cuadro 2. Análisis de la alfalfa (% base seca)

Table 2. Alfalfa analysis (% dry base)

	Alfalfa hay		
	Low-fiber	Medium-fiber	High-fiber
Dry matter	93.8	92.9	91.1
Neutral detergent fiber	33.8	38.2	45.1
Acid detergent fiber	25.4	30.6	34.3
Crude protein	21.2	16.7	18.6

(13 g/anim/d) and mixed individually into each ration.

Apparent feed digestibility was evaluated using two sampling periods: preweaning (d 41 to 50); and postweaning (d 91 to 100). Chromium oxide ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ) was used as an external marker. Each calf was given 2 g  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ /d, in the form of gelatin capsules administered at 0730 and 1730 for 10 d in each sampling period. The first five days served to reach Cr equilibrium in the gastrointestinal tract and during the following five days feces samples were collected three times daily (0800, 1200, 1800) to determine apparent feed digestibility.

Feces samples were dried in a forced air oven at 55 °C for 72 h, and all samples (i.e. feces and feed) were milled in a Wiley mill and passed through a 2 mm screen. Feces samples were composited for each animal by period and analyzed for dry matter (DM), crude protein (CP)<sup>(11)</sup>, neutral detergent fiber (NDF)<sup>(12)</sup>, and Cr in feces<sup>(13)</sup> with spectrophotometry (GBC UV / VIS 920) at 400 nm wavelength. Apparent digestibility coefficients for DM, CP and NDF were calculated using the formulas of Merchen<sup>(14)</sup>; the DM and CP provided by the milk were included in the calculations:

$$\text{DMF (g/day)} = \frac{\text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ intake (g/day)}}{\text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ concentration in feces (mg/g DM)}}$$

$$\text{DM digestibility (\%)} = \frac{\text{DMI (g/day)} - \text{DMF (g/day)}}{\text{DMI (g/day)}} \times 100$$

CP and NDF digestibility were calculated using



materia seca (MS), proteína cruda (PC)<sup>(11)</sup>, fibra detergente neutro (FDN)<sup>(12)</sup> y Cr en heces<sup>(13)</sup> utilizando un espectrofotómetro (GBC UV / VIS 920) a 400 nm de longitud de onda. Los coeficientes de digestibilidad aparente de la MS, PC y FDN se calcularon por medio de las fórmulas propuestas por Merchen<sup>(14)</sup>; en los cálculos se incluyó la MS y la PC aportadas por la leche:

$$\text{MS excretada en heces (g/día)} = \frac{\text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ consumido (g/día)}}{\text{concentración de Cr}_2\text{O}_3 \text{ en heces (mg/g de MS)}}$$

$$\text{Digestibilidad de MS(\%)} = \frac{\text{MS consumida (g/día)} - \text{MS excretada en heces (g/día)}}{\text{MS consumida (g/día)}} \times 100$$

Para el cálculo de la digestibilidad de PC y FDN, la fórmula utilizada fue:

$$\text{CDNut (\%)} = \frac{(\text{MSC}) (\% \text{ Nut en MSC}) - (\text{MSH}) (\% \text{ Nut en MSH})}{(\text{MSC}) (\% \text{ Nut en MSC})} \times 100$$

Donde: CDNut = Coeficiente de digestibilidad del nutrimento; MSC = materia seca consumida; MSH = materia seca de heces y Nut = Nutrimento (PC o FDN).

Para evaluar la concentración de ácidos grasos volátiles (AGV) en el líquido ruminal, se llevaron a cabo tres periodos de muestreo, dos de ellos antes del destete (días 25 y 55) y el otro después del destete (día 85); en los tres periodos, el muestreo se realizó a las 0800, 1100 y 1400. El líquido ruminal se colectó por medio de una sonda esofágica<sup>(15)</sup>. Inmediatamente a la extracción, las muestras se filtraron a través de cuatro capas de gasa y se procedió a centrifugar por duplicado 5 ml de líquido ruminal más 0.5 ml de una solución 2:1 v/v de ácido ortofosfórico al 85% y ácido fórmico al 25% durante 45 min a 3,400 xg utilizando una centrifuga refrigerada. El sobrenadante se separó y se congeló a -15 °C para posterior análisis. Se tomó 1 ml de la muestra descongelada, se agregó un microlitro de acetona (como estándar interno) y se leyó en un

the formula:

$$\text{Ntr DC (\%)} = \frac{(\text{DMI}) (\% \text{ Ntr in DMI}) - (\text{DMF}) (\% \text{ Ntr in DMF})}{(\text{DMF}) (\% \text{ Ntr in DMF})} \times 100$$

Where: Ntr DC = Nutrient digestibility coefficient; DMI = dry matter intake; DMF = dry matter in feces; and Ntr = Nutrient (CP or NDF).

Three sampling periods were used to evaluate volatile fatty acid (VFA) concentrations in the ruminal liquid: Period 1 pre-weaning (d 25); Period 2 pre-weaning (d 55); and Period 3 postweaning (d 85). On each sampling day, three samples of ruminal fluid were taken (0800, 1000 and 1400) using an esophageal probe<sup>(15)</sup>. Immediately after extraction, duplicated samples were filtered through four layers of gauze, and then a mixture of 5 ml of filtered ruminal fluid plus a solution of 0.5 ml of 2:1 v/v (85% orthophosphoric acid and 25% formic acid) was centrifuged at 3,400 xg for 45 min in a refrigerated centrifuge. The supernatant was separated and frozen at -15 °C until analysis. The VFA concentration was determined by adding 1 microliter acetone (internal standard) to 1 ml of defrosted sample and processed with a gas chromatographer (Hewlett Packard mod. 5840-A) with a flame detector<sup>(11)</sup>, 6-foot Free Fatty Acid Phase column and N<sub>2</sub> as vehicle.

At the end of the experimental period (d 105), three animals per treatment were randomly selected and slaughtered with a piston gun. Weight was taken for the reticulo-rumen, omasum and abomasum as a whole, with digesta, and then each compartment was emptied and individually weighed. Digesta viscosity was measured by taking samples from the rumen, abomasum and small intestine at the time of slaughter. These samples were placed in containers, 0.2N chlorhydric acid added and then frozen (-15 °C) until analysis. For analysis, samples were defrosted, centrifuged at 55 xg for 10 min and supernatant viscosity determined at 39 °C<sup>(17)</sup> with a rotational rheometer (Rotovisco, Haake brand, Germany).

Ruminal papillae size was determined using tissue samples taken by dissection<sup>(16)</sup>. Histological cuts

cromatógrafo de gases Hewlett Packard mod. 5840-A con detector de flama<sup>(11)</sup>, con una columna Free Fatty Acid Phase de 6 pies y N<sub>2</sub> como acarreador.

Al final del experimento (día 105), se seleccionaron al azar tres animales por tratamiento para ser sacrificados mediante pistola de émbolo. Se registró el peso del rumen-retículo, omaso y abomaso juntos y con contenido digestivo, y posteriormente se determinó el peso de cada uno de los compartimientos vacíos. Para determinar la viscosidad del contenido digestivo, se colectaron muestras del rumen, del abomaso y del intestino delgado al momento del sacrificio. Las muestras se colocaron en recipientes en donde se les adicionó ácido clorhídrico 0.2N, y fueron congeladas a -15 °C hasta su análisis. Al momento de su análisis, las muestras se descongelaron y se centrifugaron a 500 xg durante 10 min y se determinó la viscosidad del sobrenadante a 39 °C<sup>(17)</sup> utilizando un reómetro rotacional modelo Rotovisco (marca Haake, Alemania).

Para determinar tamaño de las papilas ruminales se obtuvieron muestras de tejido ruminal por disección<sup>(16)</sup>. Se realizaron cortes histológicos de aproximadamente 2 cm<sup>2</sup> de la pared ruminal de los sacos dorsal y ventral y se colocaron en recipientes con formol al 10% para detener la autólisis *post mortem*. Posteriormente, las muestras se deshidrataron y fueron embebidas en parafina para teñirlas por medio de hematoxilina-eosina y fijarlas en laminillas. Los cortes fueron observados al microscopio (10X) y se realizaron las mediciones de longitud y grosor de 10 papilas ruminales por muestra procesada.

Para determinar la digestibilidad *in vitro* de la alfalfa, se utilizaron las alfalfas de mayor y menor contenido de fibra, con y sin la adición de enzimas fibrolíticas. Las muestras fueron colocadas en un equipo DaisyII<sup>200/220</sup> (Ankom Technology, Fairport, N. Y.) y se incubaron a diferentes horas (24 y 48 h) dentro de contenedores con 400 ml de líquido ruminal y 1,600 ml de solución amortiguadora<sup>(17)</sup>. El líquido ruminal se obtuvo de dos vacas Holstein alimentadas con heno de alfalfa y provistas con cánula ruminal. Al término del

(about 2 cm<sup>2</sup>) of ruminal wall from the dorsal and ventral sacks were taken and placed in containers with 10% formaldehyde to stop post mortem autolysis. The cuts were then dehydrated, embedded in paraffin, stained with hematoxiline-eosine and fixed on slides. Cuts were viewed with a microscope (10x) to measure the length and width of 10 ruminal papillae per processed sample.

Alfalfa *in vitro* digestibility was determined using high- and low-fiber alfalfas, with and without fibrolytic enzymes. Samples were placed in containers with 400 ml ruminal fluid and 1,600 ml buffer solution and then incubated for two different periods (24 and 48 h) in a DaisyII<sup>200/220</sup> device (Ankom Technology, Fairport, NY)<sup>(17)</sup>. The ruminal fluid was collected from two Holstein cows fed alfalfa hay and fitted with a ruminal cannula. After incubation, the samples were frozen at -4 °C and then processed in a fiber analyzer (Ankom<sup>200/220</sup>) following the NDF procedure<sup>(12)</sup>. *In vitro* digestibility was calculated with the formulas:

$$\% \text{ IVTD} = 100 - \{ [W_3 - (W_1 \times C_1)] \times 100 / W_2 \}$$

$$\% \text{ IVTD}_{\text{DM}} = 100 - \{ [W_3 - (W_1 \times C_1)] \times 100 / [W_2 \times \text{DM}] \}$$

Where: IVTD = *in vitro* true digestibility; W<sub>1</sub> = bag weight; W<sub>2</sub> = sample weight; W<sub>3</sub> = sample weight after NDF processing; C<sub>1</sub> = blank correction (final blank bag weight / initial blank bag weight); DM = % dry matter.

Data of dry matter intake (DMI), daily weight gain (DWG), feed efficiency (FEF), digestive compartment weight, ruminal papillae size and digesta weight were analyzed using a completely randomized block design with a 2 x 3 factorial arrangement (2 FE inclusion levels; 3 alfalfa fiber levels); the week the calves entered the trial was used to define the blocks. These analyses were done with the SAS software<sup>(18)</sup>.

Data of VFA and apparent digestibility were analyzed using a split plot design in which the error for the large plot was animal (block x enzyme x alfalfa) and the error term for the small plot was the experimental error:

tiempo de incubación, las muestras se congelaron a -4 °C y posteriormente se procesaron en un analizador de fibra Ankom 200/220 siguiendo el procedimiento para determinar FDN<sup>(12)</sup>. Las fórmulas utilizadas para calcular la digestibilidad *in vitro* se muestran a continuación:

$$\% \text{ IVTD} = 100 - \{[W_3 - (W_1 \times C_1)] \times 100 / W_2\}$$

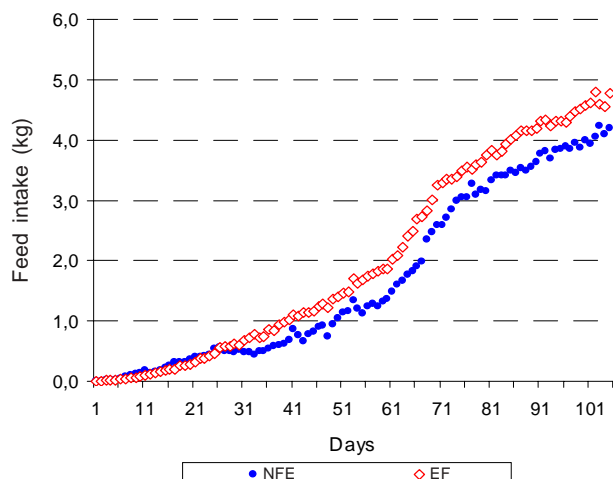
$$\% \text{ IVTD}_{\text{MS}} = 100 - \{[W_3 - (W_1 \times C_1)] \times 100 / [W_2 \times \text{MS}]\}$$

Donde: IVTD= digestibilidad verdadera *in vitro*; W<sub>1</sub>= peso de la bolsa; W<sub>2</sub>= peso de la muestra; W<sub>3</sub>= peso de la muestra al final del proceso de FDN; C<sub>1</sub>= corrección de blanco (peso de bolsa blanco final / peso de la bolsa blanco inicial); MS= % de materia seca.

Las variables de respuesta CMS, GP, EA, peso de los compartimentos digestivos, tamaño de papilas ruminales y viscosidad del contenido digestivo fueron sujetas a un análisis de varianza para un diseño de bloques al azar con arreglo factorial 2 x 3 (dos niveles de inclusión de enzimas fibrolíticas y tres niveles de fibra en la alfalfa), donde la semana de entrada de los becerros al experimento fue el bloque. Para dichos análisis se utilizó el paquete SAS<sup>(18)</sup>.

Figura 1. Evolución en el consumo de alimento sin enzimas y con adición de enzimas fibrolíticas

Figure 1. Feed intake with (FE) and without (NFE) a fibrolytic enzyme supplement in calves



$$Y_{ijklmn} = m + B_i + E_j + F_k + EF_{jk} + A(BEF_{ijk})_l + P_m + EP_{jm} + FP_{km} + EFP_{jkm} + e_{(ijkl)m}$$

Where: Y= response variable of observation *n*, in block *i*, at enzyme level *j*, with alfalfa treatment *k*, in period *m*; *m*= general mean; *B<sub>i</sub>*= effect of block *i*; *E<sub>j</sub>*= effect of enzyme level *j*; *F<sub>k</sub>*= effect of alfalfa treatment *k*; *EF<sub>jk</sub>*= effect of interaction between enzyme level *j* and alfalfa treatment *k*; *A(BEF<sub>ijk</sub>)<sub>l</sub>*= effect of animal *l* within block *i*, with enzyme level *j* and alfalfa treatment *k*; *P<sub>m</sub>*= effect of period *m*; *EP<sub>jm</sub>*= effect of interaction between enzyme level *j* and period *m*; *FP<sub>km</sub>*= effect of interaction between alfalfa treatment *k* and period *m*; *EFP<sub>jkm</sub>*= effect of interaction between enzyme level *j*, alfalfa treatment *k* and period *m*; *e<sub>(ijkl)m</sub>*= experimental error.

*In vitro* digestibility results for 24 h and 48 h were analyzed using a completely randomized design with a 2 x 2 factorial arrangement (2 FE inclusion levels; 2 alfalfa fiber levels).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Productive performance

Initial calf weight (38.7 kg) was similar (*P* > 0.10) among treatments. During the experiment one animal in Treatment 3 (medium-fiber alfalfa, no enzyme) and one in Treatment 6 (high-fiber alfalfa, no enzyme) died with symptoms of pneumonia.

Feed intake of animals supplemented with the FE tended (*P* = 0.06) to be higher than that of animals fed without FE (FE = 1.994 vs NFE = 1.651 kg/d) (Figure 1).

Inclusion of FE in feed in the preweaning period improved DWG and FEF (*P* < 0.05) without affecting DMI. In contrast, during the postweaning period, DMI was higher for calves fed FE (*P* < 0.05), but DWG and FEF were unaffected (*P* > 0.05) (Table 3).

Reports of increased DMI when using FE supplements in feed for beef cattle attribute this rise to a faster passage time and shorter ruminal residence time<sup>(19,20)</sup>. In other studies<sup>(21-24)</sup>,



Las variables con diferentes mediciones a través del tiempo, como AGV y DA, fueron analizadas con un modelo para un diseño de parcelas divididas, donde el error para la parcela grande fue animal (bloque x enzima x alfalfa) y el término error para la parcela chica fue el error experimental:

$$Y_{ijklmn} = m + B_i + E_j + F_k + EF_{jk} + A(BEF_{ijk})_l + P_m + EP_{jm} + FP_{km} + EFP_{jkm} + e_{(ijkl)m}$$

Donde:  $Y$ = respuesta a la variable de la  $n$ -ésima observación, dentro del  $i$ -ésimo bloque, con el  $j$ -ésimo nivel de enzima, la  $k$ -ésima alfalfa, en el  $m$ -ésimo periodo;  $m$ = media general;  $B_i$ = efecto del  $i$ -ésimo bloque;  $E_j$ = efecto del  $j$ -ésimo nivel de enzima;  $F_k$ = efecto de la  $k$ -ésima alfalfa;  $EF_{jk}$ = efecto de la interacción entre el  $j$ -ésimo nivel de enzima y la  $k$ -ésima alfalfa;  $A(BEF_{ijk})_l$ = efecto del  $l$ -ésimo animal dentro del  $i$ -ésimo bloque, con el  $j$ -ésimo nivel de enzima y la  $k$ -ésima alfalfa;  $P_m$ = efecto del  $m$ -ésimo periodo;  $EP_{jm}$ = efecto de la interacción entre el  $j$ -ésimo nivel de enzima y el  $m$ -ésimo periodo;  $FP_{km}$ = efecto de la interacción entre la  $k$ -ésima alfalfa y el  $m$ -ésimo periodo;  $EFP_{jkm}$ = efecto de la interacción entre el  $j$ -ésimo nivel de enzima, la  $k$ -ésima alfalfa y el  $m$ -ésimo periodo;  $e_{(ijkl)m}$ = error experimental.

Los resultados de digestibilidad *in vitro* a las 24 y 48 h se analizaron utilizando un modelo para un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2 x 2 (dos niveles de inclusión de enzimas fibrolíticas y dos alfalfas con diferente nivel de fibra).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Comportamiento productivo

El peso inicial de los becerros (38.7 kg) fue similar ( $P > 0.10$ ) entre los tratamientos. En el transcurso del experimento dos de los becerros asignados a los tratamientos 3 (alfalfa regular en fibra sin enzima) y 6 (alfalfa alta en fibra sin enzima) fallecieron, presentando signos de neumonía.

Los animales que recibieron alimento adicionado con enzimas fibrolíticas (EF) tendieron ( $P = 0.06$ ) a consumir más alimento (1.994 vs 1.651 kg/día)

Cuadro 3. Comportamiento productivo de becerros sin suplementar o suplementados con enzimas fibrolíticas en el alimento sólido

Table 3. Calf productive performance during pre-weaning and post-weaning periods when given solid feed with and without fibrolytic enzyme supplements

		NFE	SEM	FE	SEM
Prewaning	DWG, kg/d	0.40 <sup>a</sup>	0.04	0.61 <sup>b</sup>	0.04
	DMI, kg/d	0.93	0.07	1.11	0.06
	FEF	0.41 <sup>a</sup>	0.02	0.55 <sup>b</sup>	0.02
Postweaning	DWG, kg/d	1.09	0.07	1.31	0.06
	DMI, kg/d	2.60 <sup>a</sup>	0.14	3.17 <sup>b</sup>	0.13
	FEF	0.42	0.02	0.42	0.02

DWG=daily weight gain; DMI=dry matter intake; FEF=feed efficiency (weight gain/intake); NFE=no fibrolytic enzyme supplement; FE=fibrolytic enzyme supplement; SEM: standard error of the mean.

<sup>ab</sup> Different letter superscripts in the same row indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

however, FE supplements did not affect DMI but did improve DWG and feed conversion, probably due to an increase in the rapid availability of fermentable carbohydrates and stimulus to microbial growth in the rumen. The increased DMI in the postweaning period seen in calves fed FE-supplemented (FE = 3.17 vs NFE = 2.61 kg/d) possibly resulted from a higher passage rate, although the higher intake was not reflected in the DWG (FE = 1.31 kg/d vs NFE = 1.09 kg/d).

Alfalfa fiber content had no affect ( $P > 0.05$ ) on calf productive performance (DWG, DMI, FEF), and no interaction was observed between fiber content and addition of FE.

### Apparent digestibility of nutrients

Apparent digestibility for DM, CP and NDF was unaffected ( $P > 0.05$ ) by alfalfa quality or addition of FE in both the pre- and postweaning periods. Apparent digestibility was higher ( $P < 0.05$ ) during the pre-weaning period than that during the post-weaning period; the values found were: for DM (81.5 vs 72.5 %), CP (81.9 vs 70.8 %) and NDF (62.3 vs 45.3 %). Similar results have been reported

que los animales que recibieron alimento sin enzimas (SE) (Figura 1).

En el periodo predestete, la inclusión del complejo enzimático en el alimento mejoró la GP y la EA ( $P < 0.05$ ), sin afectar el CMS; en contraste, en el periodo posdestete, el CMS fue mayor en animales consumiendo EF. La GP y la EA no fueron afectadas ( $P > 0.05$ ) por la adición de EF (Cuadro 3).

Algunos autores han reportado incremento en el CMS al incluir EF en el alimento de ganado en crecimiento y engorda<sup>(19,20)</sup>, atribuido principalmente a una tasa de pasaje más rápida y a un tiempo de retención ruminal más corto; sin embargo, en otros trabajos el CMS no fue afectado por la adición de EF<sup>(21-24)</sup>, pero se mejoró la GP y la conversión alimenticia, probablemente por un incremento en la rápida disponibilidad de carbohidratos fermentables, y un estímulo en el crecimiento microbiano en el rumen. El aumento de CMS de becerros alimentados con EF en el periodo posdestete (3.17 vs 2.61 kg./día) pudo ser ocasionado por una tasa de pasaje mayor; sin embargo, el mayor consumo no se reflejó en la GP (1.31 vs 1.09 kg/día, para EF y SE, respectivamente).

El contenido de fibra de la alfalfa no afectó ( $P > 0.05$ ) el comportamiento productivo (GP, CMS y EA) de los becerros en el experimento. Asimismo, no se observó ninguna interacción entre el contenido de fibra y la adición de enzimas fibrolíticas.

#### *Digestibilidad aparente de los nutrimentos*

La digestibilidad aparente de MS, PC y FDN no fue afectada por la calidad de la alfalfa ni por la inclusión de EF en ambos periodos de muestreo (predestete y posdestete). Sin embargo, si existieron diferencias entre los periodos ( $P < 0.05$ ); los coeficientes de digestibilidad de la MS, PC y FDN fueron 81.5 y 72.5, 81.9 y 70.8, 62.3 y 45.3 % para los periodos predestete y posdestete, respectivamente. En ganado lechero se han reportado<sup>(25)</sup> resultados similares, donde la digestibilidad aparente no fue afectada por la inclusión de enzimas, pero se observó un consumo de alimento numéricamente mayor en animales consumiendo EF; los autores explican que los

in dairy cows<sup>(25)</sup> in which apparent digestibility was unaffected by an FE supplement even though feed intake was quantitatively greater in animals eating feed with FE. This is explained by an increase in the passage rate, which may be similar to what possibly occurred in the present study. The results also coincide with other studies in which feed digestibility was unaffected by addition of FE<sup>(26,27)</sup> although still other studies indicate a rise in apparent ration digestibility in dairy cows<sup>(28,29)</sup> and growing cattle<sup>(20,24)</sup>. Beauchemin *et al*<sup>(28)</sup> report improved feed digestibility in the entire digestive tube, and state that the enzymes' effect occurs at the intestinal level rather than at the ruminal level, what can explain the minimal degradation of these enzymatic complexes in the rumen<sup>(30,31)</sup>.

#### *VFA concentrations and proportions in the ruminal fluid*

Addition of FE and the alfalfa fiber content in feed had no effect ( $P > 0.05$ ) on VFA concentration in the calf's ruminal fluid, and no interaction was observed among them. Average total VFA was 78.8 mmol, just below the 80 to 120 mmol reported for adult ruminants<sup>(32)</sup>; this is to be expected since calves from 6 to 8 wk of age reach the VFA levels of adult animals<sup>(33)</sup>. The slightly lower levels in the present study may result from the sampling method since Raun & Burroughs<sup>(15)</sup> report that VFA levels tend to be lower in samples taken with esophageal probe (like the one used here) than in those taken via ruminal cannula.

The acetic to butyric acid molar ratio (Table 4) was significantly different ( $P < 0.05$ ) among periods (two preweaning and one postweaning). Propionic acid levels, in contrast, were similar ( $P > 0.05$ ) among the three periods, with values in a normal range for animals fed highly concentrated diets<sup>(32,34)</sup>.

Total VFA concentration varied by sampling time, with levels at hour 0 (i.e. before feeding) being significantly lower ( $P < 0.05$ ) than at hours 3 and 6 postfeeding (Table 5). Acid levels also varied by sampling time: the molar proportion of acetic acid was higher ( $P < 0.05$ ) at hour 0 than at hours 3 and

resultados se debieron a un incremento en la tasa de pasaje, situación que puede ser semejante a la del presente experimento. Estos resultados también coinciden con otros trabajos<sup>(26,27)</sup>, donde no se observan efectos sobre la digestibilidad del alimento; sin embargo, algunos autores mencionan un incremento en la digestibilidad aparente de la ración de ganado lechero<sup>(28,29)</sup> y ganado de engorda<sup>(20,24)</sup>. Beauchemin *et al*<sup>(28)</sup> observaron una mejoría en la digestibilidad del alimento en el tubo digestivo total, indicando que el efecto de la adición de enzimas ocurrió a nivel intestinal, más que a nivel ruminal, efecto que podría ser explicado por la poca degradación a nivel ruminal de estos complejos enzimáticos<sup>(30,31)</sup>.

#### *Concentración y proporciones de AGV en el líquido ruminal*

La inclusión de EF y el contenido de fibra de la alfalfa en el alimento iniciador no afectaron ( $P > 0.05$ ) la concentración de AGV en el líquido ruminal de los becerros y tampoco se observó ninguna interacción entre ambas, encontrándose un promedio de 78.8 mmol de AGV totales, concentración ligeramente por debajo de 80 a 120 mmol reportada para rumiantes adultos<sup>(32)</sup>. Terneros de 6 a 8 semanas de edad alcanzan los niveles propios de un animal adulto<sup>(33)</sup>; Raun y Burroughs<sup>(15)</sup> encontraron que los niveles de AGV tienden a ser menores cuando las muestras se obtienen por medio de una sonda esofágica (similar al método de muestreo utilizado en este experimento) comparado con las muestras obtenidas de animales con cánula ruminal.

La proporción molar de ácido acético y butírico (Cuadro 4) fue diferente ( $P < 0.05$ ) entre periodos (dos predestete y uno posdestete); en contraste, el ácido propiónico fue similar en los tres periodos, encontrándose los valores dentro del rango normal para animales alimentados con dietas altas en concentrado<sup>(32,34)</sup>.

La concentración de ácidos grasos volátiles totales fue diferente entre horas de muestreo, siendo menor ( $P < 0.05$ ) a la hora 0 (antes del ofrecimiento del alimento) que a las 3 y 6 h postalimentación (Cuadro 5). Adicionalmente, la proporción molar de acético

6; propionic acid levels were lowest ( $P < 0.05$ ) at hour 0; and butyric acid was highest at hour 3. These results coincide with previous research on FE supplement use in dairy cows showing no significant changes in VFA concentration and proportions<sup>(28,35)</sup>. In contrast, trials with feedlot cattle<sup>(23)</sup>, and sheep<sup>(36)</sup>, have found that VFA concentration increases with addition of enzymes to feed.

Cuadro 4. Ácidos grasos volátiles totales y proporciones molares (moles/100 moles) en líquido ruminal de becerros Holstein antes del destete (Periodos 1 y 2) y después del destete (Periodo 3)

Table 4. Total volatile fatty acids concentration and molar proportions (mols/100 mols) in ruminal fluid from calves in pre-weaning (Periods 1 and 2) and post-weaning (Period 3)

	Period 1	Period 2	Period 3	SEM
Total VFA* (mmol)	78.9	79.5	78.2	2.36
Acetic acid	54.3 <sup>b</sup>	54.2 <sup>b</sup>	55.5 <sup>a</sup>	0.36
Propionic acid	36.9	37.7	36.9	0.38
Butyric acid	8.8 <sup>a</sup>	8.1 <sup>b</sup>	7.6 <sup>b</sup>	0.25

VFA=volatile fatty acids; SEM=standard error of the mean.

<sup>ab</sup> Different letter superscripts in the same row indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

Cuadro 5. Concentración de ácidos grasos volátiles totales y proporciones molares (moles/100 moles) en líquido ruminal de becerros Holstein en diferentes periodos

Table 5. Total volatile fatty acids concentration and molar proportions (mols/100 mols) in ruminal fluid from calves before and after feeding

	0 h*	3 h**	6 h***	SEM
Total VFA (mmol)	64.8 <sup>b</sup>	86.9 <sup>a</sup>	84.8 <sup>a</sup>	2.36
Acetic acid	57.0 <sup>a</sup>	53.6 <sup>b</sup>	53.4 <sup>b</sup>	0.36
Propionic acid	35.5 <sup>b</sup>	37.6 <sup>a</sup>	38.5 <sup>a</sup>	0.38
Butyric acid	7.5 <sup>b</sup>	8.8 <sup>a</sup>	8.1 <sup>ab</sup>	0.25

VFA=volatile fatty acids; SEM=standard error of the mean.

\*Before feeding; \*\* 3 h after feeding; \*\*\* 6 h after feeding.

<sup>ab</sup> Different letter superscripts in the same column indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

fue mayor ( $P < 0.05$ ) a la hora 0 que a las 3 y 6 h postalimentación; la proporción de ácido propiónico fue menor ( $P < 0.05$ ) a la hora 0; en contraste, la mayor proporción de ácido butírico se encontró a las 3 h postalimentación. En trabajos realizados con enzimas fibrolíticas en ganado lechero<sup>(28,35)</sup>, tampoco se han encontrado modificaciones en la concentración y proporciones de los AGV, contrario a resultados registrados en animales de engorda<sup>(23)</sup> que muestran un aumento en la concentración de AGV por la adición de enzimas en el alimento; esta tendencia también ha sido evidenciada en trabajos realizados con ovinos<sup>(36)</sup>.

#### *Reología del contenido digestivo*

La viscosidad de la muestra digestiva fue similar ( $P > 0.05$ ) entre los tratamientos. Los promedios de viscosidad del contenido digestivo fueron 5.03 centipoises en el rumen, 3.98 centipoises en el abomaso y 4.73 centipoises en el contenido del intestino delgado. Un incremento en la ganancia de peso y la conversión alimenticia se observa cuando se incluyen enzimas en la alimentación de pollos de engorda, debido a una reducción en la viscosidad del contenido del tubo digestivo<sup>(4,8,37)</sup>. En rumiantes adultos se han realizado estudios<sup>(26,38)</sup> adicionando EF en el alimento, donde se observa una reducción en la viscosidad de la digesta duodenal (de 2.01 a 1.42 centipoises); sin embargo, la viscosidad en el tubo digestivo se encuentra por debajo a lo reportado para pollos de engorda (de 25 hasta  $> 200$  centipoises) alimentados con dietas basadas en centeno y cebada<sup>(37)</sup>. Algunos trabajos en rumiantes han reportado cambios en la adherencia microbiana y en la viscosidad del contenido del tubo digestivo<sup>(35,39)</sup>.

#### *Desarrollo del estómago y tamaño de papilas ruminales*

El peso total de los compartimentos con contenido digestivo (26.54 kg), del rumen-retículo (4.06 kg), abomaso (0.717 kg) y omaso (0.848 kg) vacíos no fue afectado ( $P > 0.05$ ) por los tratamientos. En varios trabajos realizados sobre el desarrollo del estómago<sup>(40-43)</sup> se señala que el peso del rumen-retículo y omaso incrementa rápidamente durante

#### *Digesta rheology*

Digesta sample viscosity was similar ( $P > 0.05$ ) among treatments. Average digesta viscosity was 5.03 centipoise in the rumen, 3.98 in the abomasum and 4.73 in the small intestine. Increased weight gain and feed conversion have been reported when enzymes are included in broiler chicken feed due to a reduction in digestive tube content viscosity<sup>(4,8,37)</sup>. Studies of adult ruminants given FE-supplemented feed report duodenal digesta viscosity is reduced (from 2.01 to 1.42 centipoise)<sup>(26,38)</sup>, although these viscosities are lower than those reported for broiler chickens fed oat-rye diets (25 to  $> 200$  centipoise)<sup>(37)</sup>. Other studies of ruminants report changes in microbial adherence and digesta viscosity<sup>(35,39)</sup>.

#### *Stomach development and ruminal papillae size*

The total weight of those compartments containing digesta (26.54 kg), as well as that of the empty rumen (4.06 kg), abomasum (0.717 kg) and omasum (0.848 kg) exhibited no significant differences ( $P > 0.05$ ) among treatments. Studies of stomach development<sup>(40-43)</sup> indicate that, when the calf ingests enough dry matter, reticulo-rumen and omasum weight increase rapidly during the first six weeks of life.

Alfalfa fiber content and FE inclusion had no effect ( $P > 0.05$ ) on ruminal papillae size. Average ventral ruminal sack papillae size was 1.93 mm long by 0.25 mm wide, while dorsal sack papillae were 0.63 mm long by 0.30 mm wide, in average. Forage inclusion level, particle size and age have shown to have a direct effect on ruminal papillae length<sup>(41,42)</sup>. Ruminal papillae development is also stimulated by the presence of fermentation end-products<sup>(40,44,45)</sup>, mainly butyrate and propionate, which were found in similar concentrations in the ruminal fluid in the present study. Average papillae size in the animals fed diets without FE was 1.86 mm long by 0.21 mm wide vs 1.69 mm by 0.29 mm wide in those fed starter feed with FE.

#### *In vitro digestibility*

The results showed no significant effect ( $P > 0.05$ ) of fiber content or FE inclusion on digestibility at



las primeras seis semanas de vida, cuando una cantidad adecuada de materia seca es ingerida por el becerro.

El contenido de fibra de la alfalfa y la inclusión de EF no tuvieron efecto ( $P > 0.05$ ) en el tamaño de las papilas ruminales. El tamaño promedio de las papilas ruminales del saco ventral fue de 1.93 mm de largo y 0.25 mm de ancho; en el saco dorsal, la longitud fue de 0.63 mm y 0.30 mm de ancho. Algunos estudios<sup>(41,42)</sup> han mostrado que el nivel de inclusión de forraje, el tamaño de la partícula y la edad tienen un efecto directo sobre la longitud de las papilas ruminales. Adicionalmente, se ha mostrado que el desarrollo de las papilas ruminales es estimulado por la presencia de productos finales de la fermentación<sup>(40,44,45)</sup>, principalmente butirato y propionato, los cuales se encontraron en concentraciones similares en el líquido ruminal de los becerros en este experimento. En animales que no consumieron EF el promedio en el tamaño fue 1.86 y 0.21 mm de longitud y grosor respectivamente vs 1.69 y 0.29 mm en los animales que si recibieron EF en el alimento iniciador.

#### *Digestibilidad in vitro*

En el Cuadro 6 se presentan los resultados de digestibilidad *in vitro* de la materia seca de las alfalfas con alto y bajo contenido en fibra sin o con la adición de EF a las 24 y 48 h de incubación. A las 24 h de incubación no se observó efecto ( $P > 0.05$ ) del contenido de fibra ni de la adición de EF. A las 48 h la digestibilidad *in vitro* de la alfalfa baja en fibra y adicionada con EF fue mayor ( $P < 0.05$ ) que las alfalfas altas en fibra, pero similar a la alfalfa alta en fibra adicionada con EF. En varios experimentos se ha indicado un beneficio en la digestibilidad *in vitro* al incluir EF<sup>(35,46,47)</sup>, sin embargo algunos de estos trabajos no encuentran la misma respuesta de las EF al estudiarlas *in vivo*. Feng *et al*<sup>(20)</sup> observaron incremento en la digestibilidad *in vitro* e *in vivo*, cuando se incluyen EF en el alimento seco, inmediatamente antes de ofrecer el alimento.

El tipo de enzima utilizado, el nivel de enzima añadido, la estabilidad de la enzima, el método de aplicación y la composición de la dieta pueden

24 h incubation (Table 6). At 48 h incubation digestibility was higher ( $P < 0.05$ ) in the treatments with low fiber and FE supplement than in those with low fiber and no FE, but similar ( $P > 0.05$ ) to those with high fiber and FE supplement. This coincides with other studies that report improved *in vitro* digestibility with the inclusion of FE<sup>(35,46,47)</sup>, although response to FE inclusion in these studies differed *in vivo*. Feng *et al*<sup>(20)</sup>, report increased *in vitro* and *in vivo* digestibility when FE is added to dry feed immediately before being given to the animal.

Fibrolytic enzyme response in an experiment can be affected by the type of enzyme used, enzyme inclusion levels, enzyme stability, application method and diet composition<sup>(48)</sup>. The increased *in vitro* digestibility observed here may have resulted from an existing synergism between ruminal microorganisms and the exogenous enzymes added to the alfalfa<sup>(39)</sup>, which would favor the hydrolytic potential in the incubation environment.

Presence of FE in the rumen can increase structural carbohydrate hydrolysis, providing more energy to microorganisms and favoring microbial protein synthesis. Addition of FE in the present study improved productive performance in the preweaning period because the enzymes produced by the ruminal bacteria may not have been sufficient to breakdown ration substrate. The benefits of the FE supplement were limited to the preweaning period because solid

Cuadro 6. Digestibilidad *in vitro* de alfalfas bajas o altas en fibra con o sin la adición de enzimas fibrolíticas (%)

Table 6. *In vitro* digestibility of low- and high-fiber alfalfas with and without a fibrolytic enzyme supplement (%)

	LF-NFE	LF-FE	HF-NFE	HF-FE	SEM
24 h	74.4	76.0	75.6	74.4	0.51
48 h	78.8 <sup>b</sup>	81.3 <sup>a</sup>	77.4 <sup>b</sup>	79.9 <sup>ab</sup>	0.78

LF=low-fiber; NFE=no fibrolytic enzyme supplement; FE=fibrolytic enzyme supplement; HF=high-fiber.

SEM=standard error of the mean.

<sup>ab</sup> Different letter superscripts in the same row indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).



afectar la respuesta de las EF al realizar un experimento<sup>(48)</sup>. El incremento en la digestibilidad *in vitro* de este estudio pudo ser debido al sinergismo existente entre las enzimas de microorganismos ruminales y las enzimas exógenas incluidas en la alfalfa<sup>(39)</sup>, favoreciendo el potencial hidrolítico dentro del ambiente de incubación.

La presencia de las enzimas en el rumen puede aumentar la hidrólisis de carbohidratos estructurales, poniendo más energía a disposición de los microorganismos y favoreciendo la síntesis de proteína microbial. Las enzimas en este experimento beneficiaron el comportamiento productivo en el periodo de predestete, porque las enzimas producidas por las bacterias ruminales posiblemente no fueron suficientes para desdoblar el sustrato de la ración. El contenido de fibra en el alimento sólido utilizado fue el mismo a lo largo del experimento, y la población de microorganismos ruminales de los animales destetados tuvo la capacidad de aprovechar la fibra de la dieta, por lo que la inclusión de EF sólo favoreció en el caso de animales antes del destete. En este experimento la viscosidad del contenido digestivo no fue afectada por la adición de EF, no obstante, ésta fue medida únicamente al finalizar el experimento, por lo que sería conveniente medirla en el periodo de predestete, cuando el becerro actúa de manera semejante a un animal no rumiante.

## CONCLUSIONES E IMPLICACIONES

La ganancia de peso y la eficiencia alimenticia de los becerros alimentados con enzimas fibrolíticas mostraron una mejoría en el periodo de predestete, al incrementar la proporción de nutrimentos que provienen de la fracción sólida de la dieta; sin embargo aún cuando en el periodo posterior al destete se incrementó el consumo de materia seca, no se reflejó de manera significativa en el comportamiento productivo. La inclusión de enzimas no afectó el desarrollo de los compartimentos gástricos y las papilas ruminales de los becerros. El contenido de fibra de la alfalfa no afectó el comportamiento productivo, el desarrollo del estómago y la digestibilidad aparente de la alfalfa añadida en las dietas; sin embargo esta digestibilidad

feed fiber content remained unchanged during the experiment and the ruminal microorganism populations of the weaned animals were able to use the fiber in the diets. Digesta viscosity was unaffected by the FE supplement, although this variable was only measured at the end of the experiment. Future research should include measurement of this variable during preweaning, when the calf gastrointestinal tract behaves more like that of a non-ruminant.

## CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

Weight gain and feed efficiency improved in pre-weaning calves given diets containing fibrolytic enzymes by increasing the proportion of nutrients in the solid fraction. In postweaning, however, addition of fibrolytic enzymes had no significant effect on productive performance even though dry matter intake increased. Inclusion of enzymes in the diet had no effect on gastric compartment or ruminal papillae development in the calves. Alfalfa fiber content had no effect on productive performance, stomach development or apparent digestibility of the alfalfa added to the diets. Addition of enzymes to starter feed may help in complementing production of the calf's own enzymes and thus aid in reducing negative effects on productive performance during the preweaning stage. The positive effects of fibrolytic enzyme supplements shown in the present study indicate these can be used in feed for replacement calves during preweaning to improve growth and feed conversion.

*End of english version*

---

*in vitro* se incrementó al incluir las enzimas. La adición de enzimas en el alimento iniciador puede servir además de complementar la producción de las enzimas propias del becerro, para ayudar a disminuir los efectos negativos que se presentan sobre el comportamiento productivo en el periodo de predestete. Tomando en cuenta el efecto positivo de las enzimas fibrolíticas, éstas podrían considerarse en la alimentación de becerras de

reemplazo en la etapa de predestete, para mejorar el crecimiento y la conversión alimenticia.

## LITERATURA CITADA

1. Sidney JL Jr, Huber JT. Digestión, metabolismo y necesidades nutritivas en pre-rumiantes. En: Church DC editor. *El Rumiante: Fisiología digestiva y nutrición*. España: Ed. Acriba; 1988:459-481.
2. Heinrichs AJ, Wells SJ, Losinger WC. A study of the use of milk replacers for dairy calves in the United States. *J Dairy Sci* 1995;78:2831-2837.
3. Quigly III JD, Schwab CG, Hylton WE. Development of rumen function in calves: Nature of protein reaching the abomasum. *J Dairy Sci* 1985;68:694-702.
4. Bedford MR, Classen HL, Campbell GL. The effect of pelleting, salt, and pentosanase on the viscosity of intestinal contents and performance of broilers fed rye. *Poultry Sci* 1991;70:1571-1577.
5. Anderson KL, Nagaraja TG, Morrill JL, Avery TB, Galitzer SJ, Boyer JE. Ruminant microbial development in conventionally or early weaned calves. *J Anim Sci* 1987;64:1215-1226.
6. Officer DI. Feed enzymes. In: D'Mello JPF editor. *Farm animal metabolism and nutrition*. London, UK: CABI Publishing; 2000:405-426.
7. Li S, Sauer WC, Mosenthin R, Kerr B. Effect of  $\beta$ -glucanase supplementation of cereal-based diets for starter pigs on the apparent digestibilities of dry matter, crude protein and energy. *Anim Feed Sci Technol* 1996;59:223-231.
8. Marquardt RR, Brenes A, Zhang Z, Boros D. Use of enzymes to improve nutrient availability in poultry feedstuffs. *Anim Feed Sci Technol* 1996;60:321-330.
9. Cowan WD, Korsbak A, Hastrup T, Rasmussen PB. Influence of added microbial enzymes on energy and protein availability of selected feed ingredients. *Anim Feed Sci Technol* 1996;60:311-319.
10. Síntesis geográfica. Nomenclatura y anexo cartográfico del Estado de Querétaro. S.P.P. Inst. Nac. Geografía, Estadística e Informática, México, DF. 1986.
11. Tejada HI. Control de calidad y análisis de alimentos para animales. Sistema de educación continua en producción animal A.C. México, DF. 1992.
12. Goering HK, Van Soest PJ. Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications). *Agric Handbook* No 379. ARS, USDA, Washington, DC. 1970.
13. Fenton TW, Fenton M. An improved procedure for the determination of chromic oxide in feed and feces. *Can J Anim Sci* 1979;59:631.
14. Merchen NR. Digestión, absorción y excreción en los rumiantes. En: Church DC editor. *El Rumiante: Fisiología digestiva y nutrición*. España: Ed. Acriba; 1988:191-223.
15. Raun NS, Burroughs W. Suction strainer technique in obtaining rumen fluid samples from intact lambs. *J Anim Sci* 1962;21:454-457.
16. McGavin MD, Morrill JL. Dissection technique for examination of the bovine ruminoreticulum. *J Anim Sci* 1976;42:535-538.
17. Operator's Manual. Daisy II 200/220 in vitro incubator. Ankom Technology 2001.140 Turk Hill Park Fairport, NY 14450.
18. SAS. SAS/SAT User's Guide (Release 6.03) Statistical Analysis System. Cary, NC, USA. 1988.
19. Beauchemin KA, Rode LM, Sewalt VJH. Fibrolytic enzymes increase fiber digestibility and growth rate of steers fed dry forages. *Can J Anim Sci* 1995;75:641-644.
20. Feng P, Hunt CW, Pritchard GT, Julien WE. Effect of enzyme preparations on in situ and in vitro degradation and in vivo digestive characteristics of mature cool-season grass forage in beef steers. *J Anim Sci* 1996;74:1349-1357.
21. Beauchemin KA, Jones SDM, Rode LM, Sewalt VJH. Effects of fibrolytic enzymes in corn or barley diets on performance and carcass characteristics of feedlot cattle. *Can J Anim Sci* 1997;77:645-653.
22. Beauchemin KA, Rode LM, Karen D. Use of feed enzymes in feedlot finishing diets. *Can J Anim Sci* 1999;79:243-246.
23. Lewis GE, Hunt CW, Sanchez WK, Treacher R, Pritchard GT, Feng P. Effect of direct-fed fibrolytic enzymes on the digestive characteristics of a forage-based diet fed to beef steers. *J Anim Sci* 1996;74:3020-3028.
24. Krause M, Beauchemin KA, Rode LM, Farr BI, Norgaard P. Fibrolytic enzyme treatment of barley grain and source of forage in high-grain diets fed to growing cattle. *J Anim Sci* 1998;76:2912-2920.
25. Lewis GE, Sanchez WE, Hunt CW, Guy MA, Pritchard GT, Swanson BI, Treacher RJ. Effect of direct-fed fibrolytic enzymes on the lactational performance of dairy cows. *J Dairy Sci* 1999;82:611-617.
26. Hristov AN, McAllister TA, Cheng KJ. Intraruminal supplementation with levels of exogenous polysaccharide-degrading enzymes: Effects on nutrient digestion in cattle fed a barley grain diet. *J Anim Sci* 2000;78:477-487.
27. McAllister TA, Oosting SJ, Popp JD, Yanke LJ, Hristov AN, Treacher RJ, Cheng KJ. Effect of exogenous enzymes on digestibility of barley silage and growth performance of feedlot cattle. *Can J Anim Sci* 1999;79:353-360.
28. Beauchemin KA, Yang WZ, Rode LM. Effects of grain source and enzyme additive on site and extent of nutrient digestion in dairy cows. *J Dairy Sci* 1999;82:378-390.
29. Rode LM, Yang WZ, Beauchemin KA. Fibrolytic enzyme supplements for dairy cows in early lactation. *J Dairy Sci* 1999;82:2121-2126.
30. Hristov AN, McAllister TA, Cheng KJ. Stability of exogenous polysaccharide-degrading enzymes in the rumen. *Anim Feed Sci Technol* 1998;76:161-168.
31. Morgavi DP, Beauchemin KA, Nsereko VL, Rode LM, McAllister TA, Iwaasa AD, Wang Y, Yang WZ. Resistance of feed enzymes to proteolytic inactivation by rumen microorganisms and gastrointestinal proteases. *J Anim Sci* 2001;79:1621-1630.
32. Fahey Jr GC, Berger LL. Los carbohidratos en la nutrición de los rumiantes. En: Church DC editor. *El Rumiante: Fisiología digestiva y nutrición*. España: Editorial Acriba; 1988:305-337.
33. Owens FN, Goetsch AL. Fermentación ruminal. En: Church DC. editor. *El Rumiante: Fisiología digestiva y nutrición*. España: Ed. Acriba; 1988:159-189.
34. Vazquez-Anon M, Heinrichs AJ, Aldrich JM, Varga GA. Postweaning age effects on rumen fermentation end-products and digesta kinetics in calves weaned at 5 weeks of age. *J Dairy Sci* 1993;76:2742-2748.

35. Kung L Jr, Treacher RJ, Nauman GA, Smagala AM, Endres KM, Cohen MA. The effect of treating forages with fibrolytic enzymes on its nutritive value and lactation performance of dairy cows. *J Dairy Sci* 2000;83:115-122.
36. Pinos-Rodríguez JM, González SS, Mendoza GD, Bárcena R, Cobos MA, Hernández A, Ortega ME. Effect of exogenous fibrolytic enzyme on ruminal fermentation and digestibility of alfalfa and rye-grass hay fed to lambs. *J Anim Sci* 2002;80:3016-3020.
37. Bedford MR, Classen HL. Reduction of intestinal viscosity through manipulation of dietary rye and pentosanase concentration is effected through changes in the carbohydrate composition of the intestinal aqueous phase and results in improved growth rate and food conversion efficiency of broiler chicks. *J Nutr* 1992;122:560-569.
38. Mir PS, Mears GJ, Mir Z, Morgan-Jones SD. 1998. Effects of increasing dietary grain on viscosity of duodenal digesta and plasma hormone and glucose concentrations in steers [abstract]. *J Anim Sci* 1998;76(Suppl 1):247.
39. Morgavi DP, Beauchemin KA, Nsereko VL, Rode LM, Iwaasa AD, Yang WZ, McAllister TA, Wang Y. Synergy between ruminal fibrolytic enzymes and enzymes from *Trichoderma longibrachiatum*. *J Dairy Sci* 2000;83:1310-1321.
40. Tamate H, McGilliard AD, Jacobson NL, Getty R. Effect of various dietaries on the anatomical development of the stomach in the calf. *J Dairy Sci* 1962;45:408-420.
41. Klein RD, Kincaid RL, Hodgson AS, Harrison JH, Hillers JK, Cronrath JD. Dietary fiber and early weaning on growth and rumen development of calves. *J Dairy Sci* 1987;70:2095-2104.
42. Beharka AA, Nagaraja TG, Morrill JL, Kennedy GA, Klemm RD. Effects of form of the diet on anatomical, microbial, and fermentative development of the rumen of neonatal calves. *J Dairy Sci* 1998;81:1946-1955.
43. Morisse JP, Huonnic D, Cotte JP, Martrenchar A. The effect of four fibrous feed supplementations on different welfare traits in veal calves. *Anim Feed Sci Technol* 2000;84:129-136.
44. Sakata T, Tamate H. Rumen epithelium cell proliferation accelerated by propionate and acetate. *J Dairy Sci* 1979;62:49-52.
45. Lane MA, Jesse BW. Effect of volatile fatty acid infusion on development of the rumen epithelium in neonatal sheep. *J Dairy Sci* 1997;80:740-746.
46. Hristov AN, McAllister TA, Cheng KJ. Effect of dietary or abomasal supplementation of exogenous polysaccharide-degrading enzymes on rumen fermentation and nutrient digestibility. *J Anim Sci* 1998;76:3146-3156.
47. Wallace RJ, Wallace SJA, McKain N, Nsereko VL, Hartnell GF. Influence of supplementary fibrolytic enzymes on the fermentation of corn and grass silages by mixed ruminal microorganisms in vitro. *J Anim Sci* 2001;79:1905-1916.
48. Yang WZ, Beauchemin KA, Rode LM. A comparison of methods of adding fibrolytic enzymes to lactating cow diets. *J Dairy Sci* 2000;83:2512-2520.